

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年12月11日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第353254号

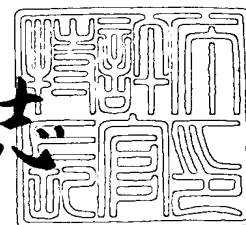
出願人
Applicant(s):

金城 政孝

1999年 6月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3035515

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009807788

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成10年12月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 12/68
C12N 15/09
G01N 33/50

【発明の名称】 標的核酸の定量分析方法

【請求項の数】 20

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 2 3 条西 1 3 丁目南新川宿舎 1 0 -
4 0 4

【氏名】 金城 政孝

【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 2 3 条西 1 3 丁目南新川宿舎 1 0 -
4 0 4

【氏名又は名称】 金城 政孝

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標的核酸の定量分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生物学的試料中に存在する標的核酸分子を定量的に分析する方法において、

標的核酸分子の離れた 2 つの塩基配列領域に対してそれぞれ相補的である塩基配列を有する第 1 および第 2 のプライマ分子を含む核酸の増幅工程、ここで、少なくとも一方のプライマは追跡可能な標識分子で標識されており、少なくとも標識されたプライマの数は既知である、

少なくとも 1 回の増幅工程を実行した検液の少なくとも一部を用いて、標識分子に関する測定データを得る測定工程、

上記測定データに基づいて標的核酸分子の分子数あるいは分子サイズを決定する決定工程、

とを有することを特徴とする標的核酸の定量分析方法。

【請求項 2】 増幅工程は、非対称な核酸増幅が達成されるように選ばれた第 1 および第 2 プライマの混合比率において実行されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 一方のプライマの数は、他方のプライマよりも少なく、且つ少ない方のプライマが標識分子で標識されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 2 種類のプライマの検液中の混合比率が、2 : 1 ~ 20 : 1 の範囲であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 2 種類のプライマの検液中の混合濃度比が、800 nM : 400 nM ~ 800 nM : 40 nM の範囲であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 測定工程が、個々の標識分子を識別し得る程度の微小視野内において経過時間内での複数の測定データを得る工程と、上記複数の測定データを時間的な位置変化を表現する統計学的データに変換する工程と、統計学的データに基づいて標的核酸分子の個数を決定する決定工程と、を含んでいることを特

徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 統計学的データが、自己相関関数を用いて演算される工程を含む事を特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 決定工程が、統計学的データをプロットすることで得られる標識分子の動的変化の曲線に基づいて実行されることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0】 測定工程が、3 次元の微小視野内において実行される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 1 1】 測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成されることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】 微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 回折限定が平均直径 $30 \pm 20 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 回折限定が平均直径 $20 \pm 10 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】 微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{nm}$ の略円柱状領域であることを特徴とする請求項 9 ～ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】 標識分子が蛍光色素を有していることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】 蛍光色素が、ハイブリダイズする前後のいずれも、測定可能な信号を発生するものであることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】 蛍光色素が、FITC、DAPI、ローダミン、Cy 3、Cy 3. 5、Cy 5、Cy 5. 5、Cy 7 から選ばれることを特徴とする請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 19】 測定工程が、単一フォトンを計測するための測定モードにより実行されることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 20】 増幅工程が、標的核酸分子の量に応じたサイクル数にて実行することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中に存在する核酸分子を増幅する技術に関し、特に、核酸増幅反応を用いて標的核酸分子を特異的に測定する方法に関する。本発明は、単一の核酸分子に関する測定データが得られるような検出方法に適用される。従って、本発明は、標的核酸分子の個数に関係した定量的結果の情報を得る任意の目的に、有効に適用できる。

【0002】

【従来の技術】

DNA や RNA などの核酸分子に関する、塩基配列決定、検出および分子量の測定は、生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段である。また、最近では、遺伝子診断や遺伝子治療においても重要な分析手段となっている。一般に、これらの分析手段を血液、尿、髄液、唾液等の生物学的試料に適用する場合には、試料中に極く微量にしか存在しない核酸分子を適当濃度に増幅してから分析を実行することによって、分析精度を高めている。例えば、遺伝子増幅法として非常に重要な PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法においては、2 種類のプライマが複数の増幅サイクルにおいて共同作業し、適当なサイクルを経て増幅された遺伝子の最終的な検出は、ゲル電気泳動法を用い、鎖長（分子量）毎の分画に分離した後に、特定位置の分画の有無を測定している。

【0003】

2 種類のプライマの共同作業によって増幅される PCR 産物は、常に、2 本鎖 DNA（dsDNA）の形態をとる。特異な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド・プローブを用いたハイブリダイゼーション反応は、PCR 産物としての dsDNA に関する塩基配列の決定に利用される。しかしながら、オリゴヌクレオチ

ド・プローブを用いたハイブリダイゼーション反応は、迅速なアニーリングの再実行を必要とする上に、両方のDNA鎖がプローブの塩基配列と相似するために、非特異的なハイブリダイズが起こり易いという問題を有する。

【0004】

PCR法を利用して増幅された後のdsDNA総量を定量的に測定する方法は、幾つか提案されている。例えば、PCR用のプライマに蛍光色素のような標識分子を標識した充分量の標識プライマを用いて、一定サイクル数のPCRが実行される。所定数のサイクルを終了したPCR産物は、例えば電気泳動を経て、ポリメラーゼにより伸長されたプライマと伸長されなかった遊離のプライマとのBound/Free分離の後に、適宜の容器中またはプレート上の検液全体が放つ蛍光強度でもって蛍光分子の総量を蛍光計測計により測定する。また、蛍光色素として、核酸増幅過程にインターカレートして初めて蛍光を発生し得るようなインターカレータ（例えば、アクリジンオレンジ、チアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー等）を用いることにより、Bound/Free分離を行うことなく、検液中においてハイブリダイズした蛍光色素のみが発する蛍光強度を測定する。

【0005】

このように検液全体から得られる蛍光総量を測定する方法は、核酸増幅の間、標的核酸分子の初期濃度がどうであれ、所定サイクル数の核酸増幅過程にプライマが不足しないように、充分量のプライマが用意されている。しかしながら、一般に、PCR法における増幅反応は、試料中の標的核酸分子の数量だけでなく標的核酸分子の種類によっても様々な反応曲線を呈するので、核酸増幅された標識分子の総量を測定する従来の分析方法では、反応過程を定量的に追跡することは困難である。特に、従来のPCR法では、遊離の標識分子をBound/Free分離したり、インターカレータの採用により遊離の標識分子からの信号を発生しないようにして、ハイブリッドを形成した後の標識分子だけを測定しているので、或る遊離の標識分子がハイブリダイズしたか否かを追跡できない。従って、従来の標的核酸分析は、遊離の標的核酸の存在下での定量分析が不可能であった。また、検液全体からの蛍光総量を測定するので、感度を高めるためには

検液を増量しなければならなかった。また、十分な核酸増幅後に測定を必要とするので、早期に標的核酸を検出するのは困難であった。また、PCRにおける核酸増幅反応の中間過程、ましてや増幅初期の標的核酸の数量を定量的に遡及するような解析が困難であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上述した核酸検出方法の実態に鑑み、遊離の標識分子も測定対象とするようにして、標的核酸分子の存在量を正確に定量する検出方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、PCR法における増幅反応を定量的に測定できる方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、少ないコピー数でも定量できる核酸分子の検出方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、微量の試料でも標的核酸分子の有無を検出できる方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、早期に標的核酸の有無を検出できる方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、PCRにおける増幅過程を分子レベルで知ることができる、核酸分子の測定方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段および作用効果】

本発明は、生物学的試料中に存在する標的核酸分子を定量的に分析する方法において、標的核酸分子の離れた2つの塩基配列領域に対してそれぞれ相補的である塩基配列を有する第1および第2のプライマ分子を含む核酸の増幅工程、ここで、少なくとも一方のプライマは追跡可能な標識分子で標識されており、少なくとも標識されたプライマの数は既知である、少なくとも1回の増幅工程を実行した検液の少なくとも一部を用いて、標識分子に関する測定データを得る測定工程、上記測定データに基づいて標的核酸分子の分子数あるいは分子サイズを決定する決定工程、とを有することを特徴とする標的核酸の定量分析方法である。

【0008】

本発明では、第1のプライマおよび第2のプライマの混合比率は、等量でないので、Gyllenaten, U. B. ら、Proc. Natl. Acad. S

ci. USA、85、7652-7656、1988に開示されている、非対称PCR (asymmetric PCR) の手法を参考にしてもよい。しかしながら、Gyllenatén, U. B. らによる非対称PCRは、専ら、塩基配列の決定を容易にするために、PCR産物として一本鎖DNA (ssDNA) を生じるように実行するものであった。非対称PCR法においては、2種類のPCR用プライマの数量が等量ではない比率、換言すると非対称な比率でもってPCRが実行される時、少ない方のプライマがPCRサイクル中に消費し終わった後、後続するPCRサイクルでは、ssDNAが毎回生成されることとなる。本発明では、この非対称PCRの手法を、塩基配列決定の為ではなく、標的核酸の定量分析に応用するために巧みに改変している点がユニークである。即ち、本発明では、非対称の比率とした一对のプライマのうち、少なくとも比率の小さい方のプライマに対して標識分子を結合させて核酸増幅反応を実行し、この小比率のプライマに結合している標識分子からの標識信号を測定する。核酸増幅過程での標的核酸に対する各プライマのハイブリダイズの確率が等しくない場合でも、遠心分離やゲル電気泳動のようなBound/Free分離を行うことなく、確実に遊離の標識分子を無くすることができるので、S/N比が極めて高い。本発明は、この高いS/N比により、検出感度の高い核酸の定量分析を実現するという画期的な作用効果をもたらす。従って、本発明の方法によれば、PCRの増幅途中または増幅前の標的核酸分子を高精度に検出することもできる。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明で行われるユニークな非対称PCRは、第2のプライマの分量を第1のプライマよりも少なく設定しするとともに、第2のプライマが光学的に測定可能な標識分子で標識されていることが重要である。この第1および第2のプライマの分量は、少なくとも1回の増幅反応工程が、過剰な標識分子の下で標的核酸分子とハイブリダイズするように下限値を設定するのが好ましい。また、図1において本発明に係わるユニークな非対称PCRの概念図のように、第2のプライマの数量(図1では、1個の標的核酸分子に対して5個の第2プライマおよび過剰量の第1プライマからなる混合比率で混合した場合)は、このユニークな非対称

PCRにおけるハイブリダイズ反応の許容回数を決定する要素となる。ここで、増幅反応工程は、非対称な核酸増幅が達成されるように選ばれた第1および第2プライマの混合比率において実行されるのが好ましい。特に、一方のプライマの数は、他方のプライマよりも少なく、且つ少ない方のプライマが標識分子で標識されているように設定するのが、さらに好ましい。ここで、2種類のプライマの検液中の混合比率は、2:1~20:1の範囲であるとき、増幅反応の生産効率が良いので好ましい。また、2種類のプライマの検液中の混合濃度比が、800 nM:400 nM~800 nM:40 nMの範囲であるときも、PCR産物の収率が高いので好ましい。

【0010】

本発明のユニークな非対称PCRによる増幅反応は、標的核酸を多量に含む試料でさえ、1サイクル以上の増幅中に第2プライマが不足することなく、完全に実行されるのが好ましい。本発明の方法は、標的核酸が少量でも検出できるので、試料含有液を少なくすることで、第2プライマのさらなる節約が可能となる。第2プライマに要求される数量は、PCRに附す試料中において自然条件で出現し得る最大量の標的核酸分子について、1回以上のPCRを完了できるように統計的に決定すればよい。従って、同量の第2プライマを用いて、種々の数量の標的核酸分子との増幅反応を実行すると、試料中に標的核酸分子が少量であればあるほど、許容回数に達するまで、即ち、第2プライマが完全に消費されるまで、PCRサイクルを繰り返す必要が有る。従って、第2のプライマの数量は、測定に付された試料中にたった1個の標的核酸が存在する場合でも、適当な回数のPCRサイクルで第1プライマが消費されるように、設定するのが好ましい。図1からも判るように、第2プライマの数量と試料含有液中の標的核酸の数量とは、非対称PCRにおいて増幅反応が飽和状態（プラトー）に達するまでに要する時間もしくはPCRサイクル数に影響する。本発明では、さらに、第1および第2のプライマがいずれかが相対的に有意に少量である場合に設定されている場合、その設定されたプライマの数が既知である、と定義する。この既知数のプライマが少数であれば、両方のプライマが同様の標識分子で標識されていてもよい。従って、第1および第2のプライマの少なくとも一方が標識されていればよい。一

方、相対的に多数のプライマは、測定に直接には寄与しないので、本質的に既知である必要はない。

【0011】

有効回数のPCRサイクルを経た試料含有の混合液の少なくとも一部は、定量的に分取されるか容器その他に収容されたまま、適宜の測定に付す。ここで、測定手法は、増幅に伴う標識分子の大きさ変化に関する測定を行うものであれば、適宜選択してよく、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、蛍光計測用フローサイトメータ、イメージサイトメータ、蛍光顕微鏡等が有効に利用できる。測定工程が、3次元の微小視野内において実行されることにより、標的分子の試料含有液の中における自由な微小運動を、PCR反応の結果に応じた自然状態のままで高精度に測定できる。これに対して、2次元的な視野内で測定すると、ブラウン運動のように、標識分子の3次元的に自由な移動をもれなく捕らえることができないので、測定精度が低い。微小視野を形成するに当たっては、ハロゲンランプからの光を収束させたり極微小の平均半径からなるアパーチャー（ピンホール、モノモードファイバ端面を通すことによって得ることもできるが、レーザ光線による収束光を利用するのが好ましく、特に、適宜の倍率と開口数からなる対物レンズにより検液内の適宜の位置に焦点が位置するようにフォーカシングした光学系を採用するのが好ましい。

【0012】

測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成するようにすれば、被写界深度の深い測定データが得られるので、個々の任意の標識分子が視野内で常に合焦して正確な位置および出力データを測定手段に供給することができる。

【0013】

微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることにより、個々の標識分子を高いS/N比で測定できる。

【0014】

回折限定が平均直径 $15 \pm 5 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることにより、少数の選ばれた標識分子からの測定データを効率良く得ることができる。

【0015】

微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{ nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{ nm}$ の略円柱状領域であることにより、測定視野内に照準された標識分子に関する自由な微小運動を効率良く取得することができる。

【0016】

本発明では、微小の測定視野内を出入りする標識分子の運動の活発度（動き易さ）を、所定空間内において1以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消出を指標として測定している。従って、第2のプライマを標識する標識分子の種類は、複数の測定時点において、ほぼ一定の出力を維持するような標識材料であるのが好ましい。このような標識分子の材料としては、発光性物質、蛍光性物質、磁性物質、放射性物質その他が挙げられる。特に、発光性物質と蛍光物質は、長時間、発光または蛍光を発するような色素を選ぶのが好ましい。標識分子として、発光色素や蛍光色素を有するものを使用すれば、光学的に容易な構成で分子レベルの測定を実行できる。ハイブリダイズする前後のいずれも、測定可能な信号を発生する好ましい蛍光色素としては、例えば、FITC、ローダミン、DAPI、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7等が挙げられる。

【0017】

測定工程が、蛍光分子の位置変化を測定する場合には、フォトマルチプライヤやフォトダイオード等の蛍光測定手段により蛍光データを受光することができる。蛍光測定手段は、単一フォトンを計測し得るような測定モードを備えている方が、蛍光分子に関する個別の測定を行うのに有利である。

【0018】

測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである場合には、本発明を更に有効な実施形態とすることができ、個々の標識分子の微小運動を正確に測定することができる。ゆらぎ運動の測定を行うに当っては、自己相関関数 (Autocorrelation function) を用いて演算するのが好ましい。特に、標識分子として、蛍光を用いる場合には、自己相関蛍光分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

y、略して FCS) を採用するのが好ましい。FCS を用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応において FCS を利用した報告 (Kinjo, M.、Rigler, R.、Nucleic Acids Research、23、1795-1799、1995) を参照することができる。

【0019】

FCS を用いた PCR の定量の可能性は、発明者自身が、等量の 2 種のプライマを用いた場合において、複製のタンパク源としての塩基である dUTP に蛍光分子を標識して、PCR を行った所、少ない PCR サイクルでも標的核酸分子の検出が可能となることを発見した。しかし、この発見した方法は、蛍光測定の前に、標的核酸分子に結合しなかった蛍光分子を除去する工程が必要であった。そこで、発明者は、PCR 法により、未結合の標識分子を除去することなく、標的核酸分子を定量できる新たな方法をさらに突き止めた。

【0020】

FCS を実施する装置の概略は、図 2 に示す。この FCS 装置は、共焦点光学系を用いた倒立型の蛍光顕微鏡 1 と試料からの蛍光を測定するためのフォトマルチプライヤ 2 と測定データを受信して自己相関関数による演算を行って数値化またはグラフ化を行うデータ処理装置 3 と、演算結果を画面上に表示する表示装置 4 とを備えている。

【0021】

試料含有液 11 は、図 2 に示す通り、試料台 12 に載せたスライドガラス 13 上に点着させることで、簡単にセットできる。この装置では、特に、微量の試料含有液 11 を用いるため、水分の蒸発を防止するための蓋 14 をスライドガラス 13 上にかぶせてある。この蓋 14 は、好ましくは、光透過性になるべく低いものを用いることで、気密性と遮光性を同時に得られる。但し、蓋の内面は、励起光線の反射を防止するように、できるだけ光反射性の低いものを使用するのが好ましい。試料含有液 11 が位置するスライドガラス 13 部分の真下には、試料含有液 11 中で焦点を結ぶように設定した対物レンズ 15 が配置している。なお、蛍光顕微鏡 1 は、落射型でもよい。落射型においては、対物レンズ 15 のレン

ズ下面に直接的に試料含有液11を点着してもよい。また、蛍光顕微鏡1の光源であるレーザー発生装置16は、図2ではアルゴン(Ar)イオンレーザーを使用しているが、蛍光の種類に応じて、クリプトンアルゴン(Kr-Ar)イオンレーザー、ヘリウムネオン(He-Ne)レーザー、ヘリウムカドニウム(He-Cd)レーザー等に種々変更して構わない。また、蛍光顕微鏡1におけるスライドガラス13の搬入や搬出、スライドガラス13等への試料含有液の点着、蓋14の開閉等の各種動作は、必要に応じて適宜自動化してもよい。

【0022】

図3は、図2の 蛍光顕微鏡1の測定部分を示す拡大図である。図3(A)において、スライドガラス13と所定の開口数(図では $FA=1.2$)の対物レンズ15との位置関係により、微小視野領域20が形成される。この微小視野領域20は、図3(B)に示すように、実際には、ボリュームを持ったレーザー光線の焦点(図では中間のくびれた部分)から上下に伸びた略円柱状の視野を有している。この視野領域20は、焦点を基準位置として、光軸上の長さZと平均半径Wにより規定される。このような、微小領域20における蛍光測定は、蛍光分子の微小運動を追跡し得る最小限の領域にまで小さくすることにより、試料含有液11中の焦点付近以外の蛍光分子に由来するノイズを有効に除去し、1個ずつの蛍光分子を正確に測定するのに寄与している。

【0023】

本発明は、上述した種々の実施の形態に基づき、遺伝病診断、親子鑑定、犯罪調査、遺伝子治療、分子生物学的研究、医薬品開発等に応用可能である。上述した実施の形態についても、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、変更可能な発明を包含する。例えば、上述した実施の形態では、測定装置として、蛍光顕微鏡の試料台にて、顕微鏡観察時と同じ環境下で測定可能なものを説明したが、欧州公開特許第640828A1号に開示している装置を改良し、サーマルサイクラーの内部の試料含有液に対して、対物レンズから出射するレーザー光をフォーカシング可能となるように光学的に設計すれば、試料含有液をスライドガラス上に移すことなく、増幅反応を連続的に測定できる。また、PCRサイクルにおける経過時間内の複数データの取り方は、所定サイクル後の一定時間内に継続的また

は断続的に複数得る場合と、異なるサイクル毎に適当数の測定データを得る場合の何れもあり得る。

【0024】

以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されることなく、発明の主旨に基づいて、本発明の出願時の技術水準に応じて自明な範囲における種々の変更が可能である。

【0025】

【実施例】

Rho-プライマによる500bp DNAの増幅量及びFCS測定で算定した蛍光分子の総数

(1) ユニークな非対称PCRの実施

プライマの準備とPCR用の混合液の調製

2種類の非標識のプライマ（プライマ1；5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG-3'、プライマ2；5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGC-3'、北海道システムサイエンス製）と、これらプライマを蛍光分子であるロードミンで標識した2種類のプライマ（Rho-プライマ1、Rho-プライマ2、宝酒造（株）製）および鋳型（template）DNAとしての全長ラムダ・ファージDNA（48.5kbp、 3.2×10^7 Da、1bp=660Da）を表1に示すような組合せと濃度により、2.5UのポリメラーゼAmpli Taq GoldTM（PE Applied Biosystems製）および0.2mMのdNTPとともに、10mM Tris-HCl、50mM KCl、1.5mMのMgCl₂、0.001%ゼラチン、pH8.3の緩衝液25μl中に混和した。鋳型（テンプレート）の濃度は、1ng/25μl～0.1fg/25μlの間で変えた。それは、 $1.9 \times 10^7 \sim 1.9 \times 10^1$ 分子/25μlに相当する。

【0026】

PCRによる増幅反応の実施

上記鋳型DNAの500bpの塩基配列に関するPCR反応は、プログラム可能なサーマルコントローラーであるModel PC-700（アステック社製）

を使用し、まず、96℃で15分間の事前の変性工程用のプレインキュベートを行った後に、55℃で1分間のアニーリング工程、72℃で2分間の伸長工程および96℃で1分間の変性工程というPCRサイクルを50回のサイクル数で実行した。

【0027】

(2) FCSによる増幅反応結果の測定

測定用の混合液の測定

50サイクルの増幅反応の後に、適当量(10 μ L)の混合試料液を、カバーガラスLab-Tek(商標)(Nalge, Nunc社製)上にピペッティングにより点着し、共焦点光学系を有する倒立型のFCS装置であるConfoCor(商標)(Carl Zeiss製)の試料台にセットした。倍率40倍、開口数1.2を有する対物レンズC-Apocromat(商標)(Carl Zeiss製)をカバーガラス上の試料含有液に対してフォーカシングするようにした。アルゴンレーザーの励起光を用いた測定期間中(1分間)の試料含有液からの蒸発を防ぐために、カバーガラス上に点着した試料含有液の液滴上にさらに同様のカバーガラスを載せた上で、蛍光測定を室温にて実行した。なお、このFCS装置における微小視野としての検出領域の体積を、標準サンプルとしてローダミン6Gを用いた拡散時間の測定によって定義付けしたところ、検出領域の長さに対する径の比Sは、約5.2であり、体積要素は計算により 1×10^{-15} Lであった。FCS測定した後に、試料混合液をアガロースゲル電気泳動により、分画を確認した。

【0028】

測定データの統計学的データへの変換

焦点上のレーザービームの強度分布はガウシアン分布であるが、蛍光観測領域は準円筒形状で表した。それゆえ、サンプル液中に焦点を結んだレーザービームは非常に小さい円筒形状の場を形成し、その中に蛍光粒子がブラウン運動で出入りしている。その微小領域における蛍光粒子の数の変動により引き起こされた蛍光強度の変動がモニター出来る。蛍光強度の変動は自己相関関数を用いて解析され、焦点領域内の分子の平均数と並進拡散時間が求められた。蛍光自己相関関数

G(t) は、蛍光分子の平均数 (N)、フリープライマの並進拡散時間 (τ_{free}) 及び伸長プライマ (τ_{poly}) を用い、式 1 により単純な 2 成分モデルで近似させた (Rigler, R. ら、Fluorescence Spectroscopy、13-24、In J. R. Lakowicz (Ed.)、1992 参照)。なお、 $\tau_{free, poly} = w_o^2 / 4 D_{free, poly}$ 及び $S = w_o / z_o$ 、ここで y は伸長プライマの割合、 w_o は検出領域の径 (体積要素)、 $2 z_o$ は領域長、 D_{free} 及び D_{poly} はそれぞれフリーと伸長プライマの並進拡散定数である。体積要素における拡散時間は、拡散定数に關係している。FCS によるデータ解析は、非線形最少二乗法を用い、「FCS」と言うコンピュータープログラム (EVOTEC BioSystems 社、) で行った。

【0029】

【表 1】

Primer concentration			y	N	Total
Primer1 (nM) (Rho-primer1)*	Primer2 (nM) (Rho-primer2)*	Primer ratio			
800	400*	1:0.5	0.30	900	120
800	40*	1:0.05	0.60	90	24
800	4*	1:0.005	0.52	8	2.1
400*	800	0.5:1	0.35	863	140
40*	80	0.05:1	0.21	76	8.4
4*	800	0.005:1	ND	9	ND

【0030】

【数 1】

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left[\left\{ \frac{1-y}{1 + \frac{t}{\tau_{free}}} \sqrt{\frac{1}{1 + S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{free}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1 + \frac{t}{\tau_{poly}}} \sqrt{\frac{1}{1 + S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{poly}}}} \right\} \right]$$

【0031】

表 1 において、フィット曲線では、 τ_{free} (0.17 ms) と τ_{poly} (1.98 ms) は自由なパラメターを減らすために、固定してある。なお、表 1 において、 a は、増幅されたローダミン標識プライマーの産生量、 b は、焦点領域に於ける蛍光分子の平均数、 c は、総産生量 (総産生量は蛍光標識プライマ

一の初期濃度とローダミン標識プライマーの増幅産生量 (y) から計算した)、 d は、ローダミン標識プライマーの濃度、 e は、Non-Detected (検出出来ず) を意味する。

【0032】

表1の結果は、非対称PCRにおけるプライマ・セットの最適比を決定するために行った予備実験の結果である。6通りのプライマ比、即ち、1 ngの鋳型の存在下に、プライマ1:Rhooプライマ2に対して3通り(800 nM:400 nM、400 nM:800 nM、4 nM:800 nM)、そして、Rhooプライマ1:プライマ2(400 nM:800 nM、400 nM:800 nM、4 nM:800 nM)、をテストした。50サイクルのPCRの後、10 μ Lの反応液がカバーガラスの上にセットされ、1分間FCSで測定した。図4は典型的な蛍光自己相関関数を示す。Rhooプライマ2 ($\tau_{free} = 0.164$ ms) の並進拡散時間はサーマルサイクルを受けていない対象サンプルから定義した(図4の丸印)。

【0033】

PCR50サイクル後、プライマ1:Rhooプライマ2(400 nM:800 nM)の条件下における、フリーRhooプライマ(図4の丸印でプロットした曲線)と、非対称PCR産物の自己相関関数。曲線は式1でフィットして得られた。そして、フリーRhooプライマ $\tau_{free} = 0.164$ msの並進拡散時間、及び増幅されたDNAの並進拡散時間と増幅産物の収率をそれぞれ $\tau_{poly} = 1.98$ 、 $y = 0.6$ として、式1に与えた。もう一つの対象サンプル(酵素を除いて、サーマルサイクルはかけてある)もまた測定された。ここではデータは示していないが、結果は0.169 msであった。500 bp DNA (PCRプロダクト)の並進拡散時間は自己相関曲線から計算され、 $\tau_{poly} = 1.98$ msであった(図4の四角印でプロットした曲線)。この値はロッド様分子の並進拡散定数の理論計算によると、500 bp長のDNAと一致した。このように、増幅産物は自己相関関数における変化からよく決定することが出来た。フリープライマと増幅プライマの並進拡散時間の違いから、増幅産物の割合を定量することが出来た。

【0034】

この解析では、 τ_{poly} 、 τ_{free} 及びSがフィッティングで固定され、自由なパラメーターの数を減らし、フリーと伸長したパラメーター(y)の比を明確にした。フリープライマと産物はサーマルサイクルの後でも、物理的に分離されていないけれども、この解析により、産物の量を測定することが可能であった(表1)。プライマ1:Rhoプライマ2が800nM:40nMの場合には、残ったフリープライマとPCR産物の比(y=0, 6)は他よりも良かった。800nM:400nMのプライマー比では、500bpの総生産量は他のプライマ比の場合よりも良かった。しかしながら、フリープライマのほぼ70%がまだ残っていた。プライマ比が800nM:4nMでは、Rhoプライマ2の全部がPCR産物に組み込まれることが予想されていたけれど、ラベルされたプライマ2の約半分だけが組み込まれ、産物の生産量は800nM:40nMの比の場合よりも良くはなかった。従って、好ましいプライマの濃度比は、800nM:400nMまたは800nM:40nMであり、これら濃度比の間に相当する濃度比を適宜選択すればよいといえる。概して、好ましいプライマ比率は、2:1~20:1の範囲と考えられる。測定対象としての標識分子を逆にして見たところ、Rhoプライマ1:プライマ2が、400nM:800nM、40nM:800nM、4nM:800nMとした場合では、PCR産物の生産量は0.35以下であった。このように、一对のプライマのどちらに測定のための標識分子を結合させるかは、PCR生産量が高まるように、標的核酸分子やプライマ分子の種類や鎖長さ等に応じて適宜設定するのが好ましい。

【0035】

図5は、増幅標的産物、500bp、はFCSによる定量測定の後、アガロースゲル電気泳動により解析した結果を示したものである。すなわち、異なるプライマー比における非対称PCR産物のアガロース電気泳動による特性解析50サイクル後の非対称PCR液(3 μ L)を1.4%アガロースゲルに添加した。図5(A)は、エチジウムブロマイド染色をしない場合、図5(B)は、エチジウムブロマイド染色した場合である。レーン1:HaeIIIで消化した Φ X174マーカー、レーン2:プライマ1:Rhoプライマ2比 800nM:400

nM、レーン3：プライマ1：Rhοプライマ2比 800 nM：40 nM、レーン4：プライマ1：Rhοプライマ2比 800 nM：4 nM、レーン5：Rhοプライマ1：プライマ2比 400 nM：800 nM、レーン6：Rhοプライマ1：プライマ2比 40 nM：800 nM、レーン7：Rhοプライマ1：プライマ2比 4 nM：800 nM、レーン8：コントロール（通常プライマ使用PCR）、レーン9：コントロール（Rhοプライマ2）、コントロール（Rhοプライマ1とRhοプライマ2によるPCR）、500 bpとRhοプライマ2の位置は矢印で示した。500 bpとRhοプライマの間のかすかな太いバンドはプロモフェノール色素である。

【0036】

500 bpのローダミン蛍光バンドはすべての場合において、エチジウム染色なしに検出出来た（図5（A））。PCR産物もまた電気泳動後エチジウム染色によって確認出来た（図5（B））。500 bpのssDNA（single stranded）はゲルでは明瞭ではなかった。理由はssDNAの蛍光強度はこの染色方法ではdsDNA（double stranded）のそれよりも弱いからである。Rhοプライマ1：プライマ2比が40 nM：800 nM及び4 nM：800 nMの場合には、スミアーと非特異的バンドがゲル内に検出された（図5、レーン5-7）。逆に、プライマ1：Rhοプライマ2比が800 nM：400 nM、800 nM：40 nM、800 nM：4 nMの場合には、500 bpバンドは明瞭に検出出来た。また、その強度は比が1：0.05から1：0.005に変化するにつれ減少した（図5、レーン2-4）。これらの結果は、FCS測定結果（表1）と良く一致した。プライマ1：Rhοプライマ2比が800 nM：40 nMがこのあとの実験に使用された。理由は500 bpの産生量（ $y=0.6$ ）が他の比の場合よりも多かったからである。FCSをベースとしたFA-PCR検出法は定量的正確性と簡便性と言う長所を有している。たった10 μ Lの反応液量で、FA-PCR後、1分間のFCS測定で目標遺伝子を検出出来る。もしも少数の鋳型遺伝子コピーがFA-PCR出来、FCSで測定出来たら、大変に興味深いものである。

【0037】

図6は、本発明の上記方法の感度を調べる為に、 $25\mu\text{L}$ の反応液中におけるPCR前の初期鋳型濃度を 1.9×10^7 から 1.9 分子の間で変化させた結果である（ 1.9×10^7 は白抜き逆三角印、 1.9×10^6 は黒三角印、 1.9×10^5 は白抜き丸印、 1.9×10^4 は黒四角印、 1.9×10^3 は白抜き菱形印、 1.9×10^1 は白抜き三角印、 1.9 は黒丸印で示した）。Rhoprime 2の自己相関関数 $G(t)$ は、50サーマルサイクル後の鋳型数の増加に比例して長い相関時間の方向（図6の右方向）に移行した。これは伸長したRhoprime 2の増加に相当している。産生量及びFA-PCR産物の数は式1によって計算した。

【0038】

光計測領域における蛍光分子の平均数は、図7に示した。標識DNA分子の数への影響は特になかったため、反応容器表面やガラスへの特異的あるいは非特異的吸着はこの実験では検出出来なかった。図8は、初期鋳型濃度に対する5000bpの収率（%）を示すようにしたグラフであり、 $25\mu\text{L}$ 中 10^2 から 10^4 分子までの範囲では、PCR産物の産生量が鋳型DNA分子の初期個数に依存し相関していたので、その範囲は定量測定範囲として使用出来る。初期量として $25\mu\text{L}$ 中に190の鋳型分子が存在している場合でも、増幅DNAの相関値の減少曲線は分離出来、明瞭に検出出来た。 10^5 以上の鋳型分子の場合、50サイクル後にはプラトー効果が観察された。いくつかの要因がこのプラトー効果に寄与しているが、この効果はサイクル数と単純に相関していた。それ故、初期鋳型分子が高濃度であるような領域の測定については、サーマルサイクル数を減らすことによって、定量測定範囲を最適化することが出来る。

【0039】

発明者が、行った実験においては、PCRの反応条件を最適化するにつれて、20個の鋳型DNA分子が試料中に存在する場合でも、検出できる所まで、突き止めた。PCRその他の反応条件をさらに最適化すれば、5個以内の鋳型DNAの検出レベルにまで設計することは、容易と考えられる。このような実験結果の示す傾向は、本発明の方法が、原理的には、たった1分子の鋳型DNAが存在

する場合でさえ検出可能であるということを強く示唆している。

【0040】

図9は、異なるPCRサイクル数のそれぞれについて、反応のための混合液25 μ L中の初期鋳型数とPCR産物の収率(%)を示したものである。この結果によれば、例えば、初期鋳型数が 10^6 以上の多量の場合には20サイクルまたはそれ以下のサイクル数、 $10^4 \sim 10^6$ の範囲では30サイクル、 $10^2 \sim 10^4$ の範囲では40サイクル、 10^3 以下では50サイクルまたはそれ以上のサイクル数の非対称PCRが、標的DNAの定量に利用可能であると認められる。特に、初期鋳型数が高濃度の場合には、PCRサイクル数を減らすことによって、定量可能範囲が最適化されるといえる。このように、定量可能なサイクル数におけるデータが得られれば、サイクル数を遡る(例えば乗算する)ことにより、初期鋳型数を決定することができる。

【0041】

図10は、図9の測定データを、開始時の鋳型DNA数毎に振り分けた時の、PCRサイクル数に対するPCR生産量を示すグラフである。この結果からは、初期鋳型数が 2×10^3 存在していれば、明確に定量できるということが分かった。また、図9のデータを考慮すると、 2×10^2 存在していても定量可能と推測できる。

【0042】

FCSを用いた標的遺伝子の検出は、最近いくつか報告されている。NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)がFCSと結合され、血清中のHIV(Human Immunodeficiency Virus)の診断に有効な検出法であることが分かった(Oehlenschlaeger, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 12811-12816, 1996)。このNASBA法は、PCRの変法であるが、T7RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、及びRNaseHと言う、3つの酵素の存在下で、2つのプライマと、プローブとして蛍光標識した別途のプライマとを必要とする。より簡単な方法(FCSによる増幅プローブ伸長検出法、APEX(Amplified Probe Extension)が

同じグループから報告されている (Walter, N. G. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、12805-12810、1996)。それでも、順方向 (forward) プライマと逆方向 (reverse) プライマ・セットの他に、プローブとして蛍光標識した別途のプライマを必要とする。このAPEXの実験では、自己相関関数の時間的変移が26サイクル後に観測される。

【0043】

蛍光エネルギー転移解析のような蛍光クエンチングに基づいたPCR定量法が以前に報告されている (Heid, C. A. ら、Genome Res.、6、986-994、1996、Livak, K. J.、PCR Method Appl.、4、357-362、1995)。この技法は市販されているが、第1、第2のPCRプライマ・ペアの他に、前節で述べたNASBA法とかAPEX法と同じく、一つのプローブ・シーケンスの中に2種類の色素を含んでいる。プローブのオリゴ塩基設計にあたっては、プライマの塩基配列と競合しない塩基配列を考えるだけでなく、融解温度 (T_m) も考慮する必要がある。しかも、ドナーとアクセプター色素の位置も蛍光強度の増加効率及びポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性に影響する。

【0044】

もう一つのゆらぎ分光法 (蛍光クロスコリレーション分光法) が均一溶液中における特定目標遺伝子の検出法として報告されている (Castro, A. ら、Anal. Chem.、69、3915-3920、1997、Rudolf Riggler ら、J. Biotechnology、63、97-109、1998)。クロスコリレーション法では、標的核酸の異なる位置に結合する2つのプローブまたはプライマを互いに異なる吸収波長からなる2種類の蛍光色素で標識している。測定に際しては、2種類の蛍光標識が1つの核酸分子とハイブリダイズしているのを確認するために測定装置の光学系も大型且つ複雑となる。2種類の蛍光色素の存在は、非常に低濃度の標的核酸配列を検出可能にするが、依然として、2種類の蛍光プローブ (またはプライマ) を必要とすることにより、簡便性、試薬コストともに不利である。

【0045】

簡便性の観点からは、FCSに基づいたPCR定量法は上述したエネルギー転移法およびクロスコリレーション法に比べて、重要な利点を有する。PCRの再現性と感度は、酵素のタイプ（P o l Iタイプ或いはタイプ）、プライマ配列、及び反応条件に強く依存する。一度これらの条件が決定されると、FCSに基づいたFA-PCRはプライマ比をわずかに変えるだけで、通常のPCRアッセイにすぐに応用出来る。それ故、ルーチンのPCR条件はFA-PCRの条件に容易に変更出来る。しかも、RT-PCR（逆転写PCR）のような他の増幅方法も、この方法に変更することが出来、将来的には一個の細胞中のmRNAを定量することも出来る。

【0046】

ゲル電気泳動及びカラムクロマトグラフィーではPCR産物はプライマと副産物から分離される。しかしながら、目標産物は電気泳動とゲル物質からの抽出課程で希釈され、さらにヌクレアーゼと接触する機会もあり、変成することもある。逆にFCSでは測定後のサンプル回収に便利であり、それはサンプル液滴はカバーガラスの上に置くだけであり、FCSは非浸襲性であるため、PCR溶液は希釈されることがなく、測定中に変成することもない。ここに述べたFCSに基づいたFA-PCR検出法は、ゲル濾過法のような物理的分離法を用いることなく、反応条件下で蛍光標識したプライマのみを必要とするだけである。また、ゲル電気泳動の分解能は比較的高く、1塩基の長さの違いを検出出来るが通常1時間程度の泳動時間を要するのに対して、FCSは非常な高速測定であり（実施例では1分間）、例えば臨床検査やスクリーニング検査のような大量検体検査では利点がある。FCS検査後のサンプルは直ちにゲル電気泳動等で詳細に解析出来、FCS測定結果を確認したり、塩基配列を解析したり出来る。かつまた、回収されたサンプルは後に続く実験に使用することが出来る。たとえば、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることが出来る。もしも、FCS測定後に増幅サンプルを回収する必要がなければ、キャリーオーバーによる汚染の危険性もなく廃棄出来る。というのは、FCSは非接触型の測定法だからである。

【0047】

FCSは非侵襲性であり、直接測定を可能にするので、PCRサンプル量はFCSが必要とする測定量で決まる。発明者による今回の測定は $10\mu\text{L}$ のサンプル量で行ったが、理論的には 10^{-15}L の体積要素レベルまで減らすことが出来る。しかし、PCR量は $1\mu\text{L}$ まで減らすことが出来れば、他の方法と比べて、経済面で大きな利点と言える。かつまた、FCSは蛍光顕微鏡を基礎としており、検出領域を対物レンズ上におくことが出来るため、*in-situ*PCRによる特定のRNAやDNAの定量に用いることが出来る。

【0048】

発明者は、PCR溶液の解析に2成分モデルを使用して、良好な結果を得た。しかし、他の実験では多くのDNA種が存在するかもしれない。そのような場合には、DNAの種は従来のゲル電気泳動法で良く分離出来る。観測されたFCSデータのモデル関数からの相関曲線の違いから溶液中に分布する他の成分の存在が示唆することができるが、単純な2成分モデルはそのような場合は限界があると思われる。その結果、もっと詳細な定量解析が必要とされる場合は、CONTIVN (Max-Planck Institute 製) のようなコンピュータプログラムを用いて、分布関数を得る多成分FCS解析法の開発が必要である。

【0049】

本発明の方法は物理的分離方法を用いることもなく、非侵襲的、非接触的であり、使用するサンプル量も少ない。このような少量のサンプルの物理的取り扱いには毛細管を使用したり、薄いカバーガラスや、フィルムをかぶせたガラス表面上の小さな穴を用いて行うことが出来、リアルタイム解析に用いることも出来る。

これらの特性とさらなる改良により、増幅課程のモニターは容易に（リアルタイム・モニタリング）、自動検出システム（ロボティックス）も可能であることは明白である。故に、FCSに基づいたFA-PCR定量法は、感度、定量精度および簡便性において利点を有すると結論できる。さらに、FCSの分解能は即ち使用する顕微鏡の空間分解能であるので、細胞内の一部を空間的に選んで測定することも容易である。例えば、GFP（緑色蛍光タンパク）を用いて融合蛋白の

細胞内の分子輸送を測定することができる。さらに、この方法は迅速スクリーニングのみならず、分子診断の新時代を開くものと期待している。

【0050】

【発明の効果】

本発明によれば、プライマに標識分子を標識してPCRによる増幅反応を行うとともに、微小視野内で測定するようにして個々の標識分子の挙動の変化を統計学的に解析したので、試料中の標的核酸の存在量を正確に定量的に検出できる。また、相対的に有意に少ない量の第2プライマに対して標識分子を結合させて用いるので、PCRサイクル中に確実に遊離の標識分子が消化されるので、Bound/Free分離を行うことなく、取り扱いが簡単となって自動化にも適しており、しかも、試薬コストも安くなる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明に係わる非対称PCRの概念図。

【図2】

図2は、本発明の方法を実施するための装置の一例を示す概略図。

【図3】

図3は、図2の装置の一部拡大図。

【図4】

図4は、典型的な蛍光自己相関関数を示すグラフ。

【図5】

図5は、増幅標的産物、500bp、はFCSによる定量測定の後、アガロースゲル電気泳動により解析した結果を示す図。

【図6】

図6は、本発明の方法の感度を調べる為に、25 μ Lの反応液中におけるPCR前の初期鋳型濃度を 1.9×10^7 から1.9分子の間で変化させた場合のそれぞれの蛍光自己相関関数を示すグラフ。

【図7】

図7は、図6で行った初期鋳型濃度毎の測定時の光計測領域（微小視野）にお

ける蛍光分子の平均数。

【図 8】

図 8 は、初期鋳型濃度に対する 5000 bp の収率 (%) を示すようにしたグラフ。

【図 9】

図 9 は、異なる PCR サイクル数のそれぞれについて、混合液 25 μ L 中の初期鋳型数と PCR 産物の収率 (%) を示したグラフ。

【図 10】

図 10 は、図 9 の測定データを、開始時の鋳型 DNA 数毎に振り分けた時の、PCR サイクル数に対する PCR 生産量を示すグラフ。

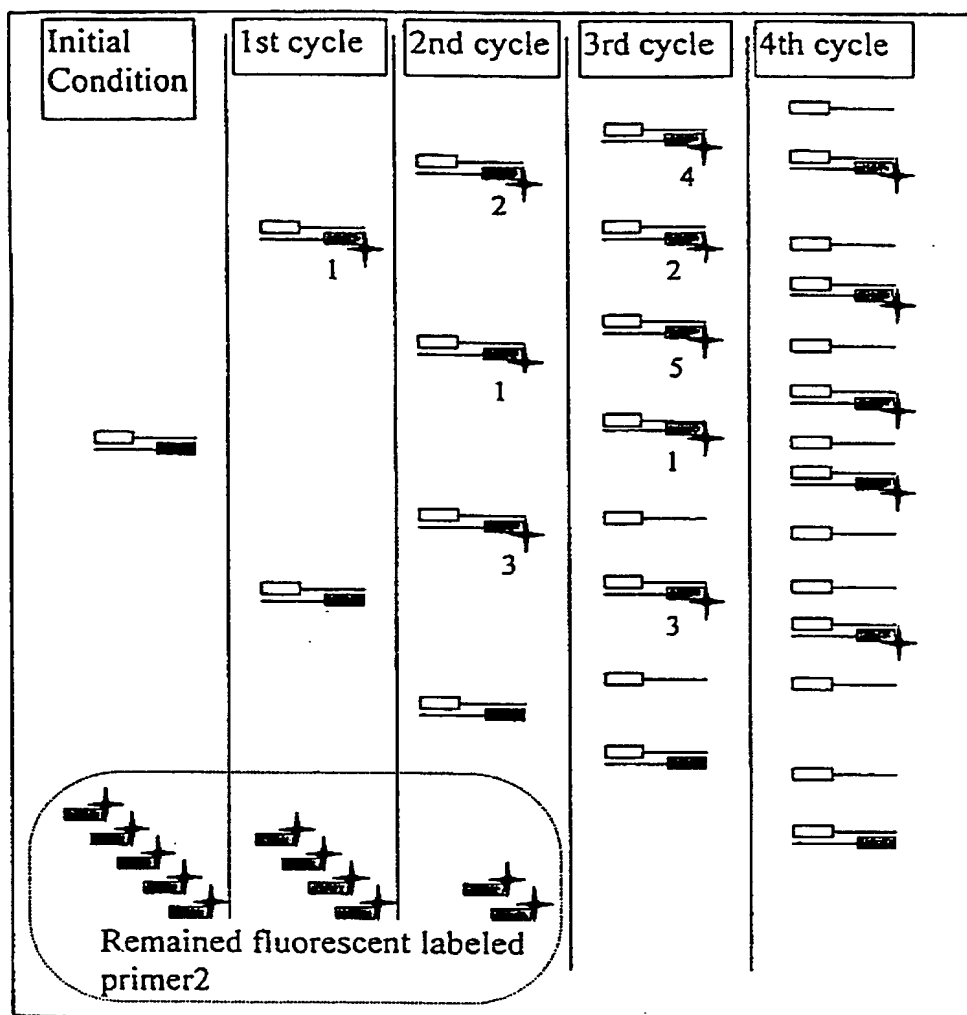
【符号の説明】

- 1 … 蛍光顕微鏡、
- 2 … フォトマルチプライヤ、
- 3 … データ処理装置、
- 4 … 表示装置、
- 11 … 試料含有液、
- 12 … 試料台、
- 13 … スライドガラス、
- 14 … 蓋、
- 15 … 対物レンズ、
- 16 … レーザー発生装置。

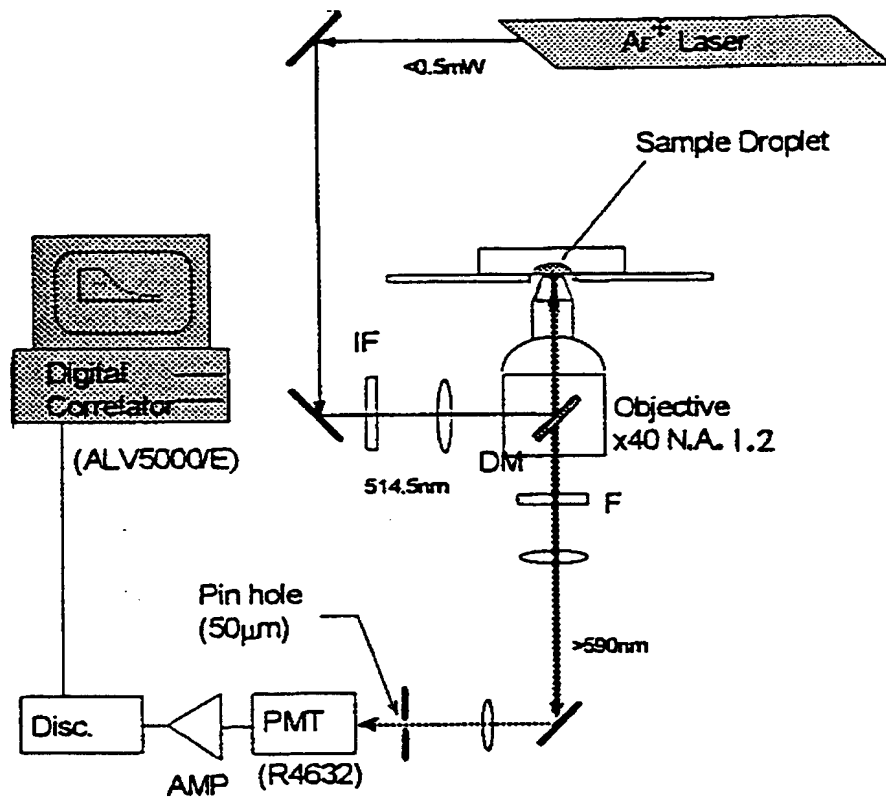
【書類名】

図面

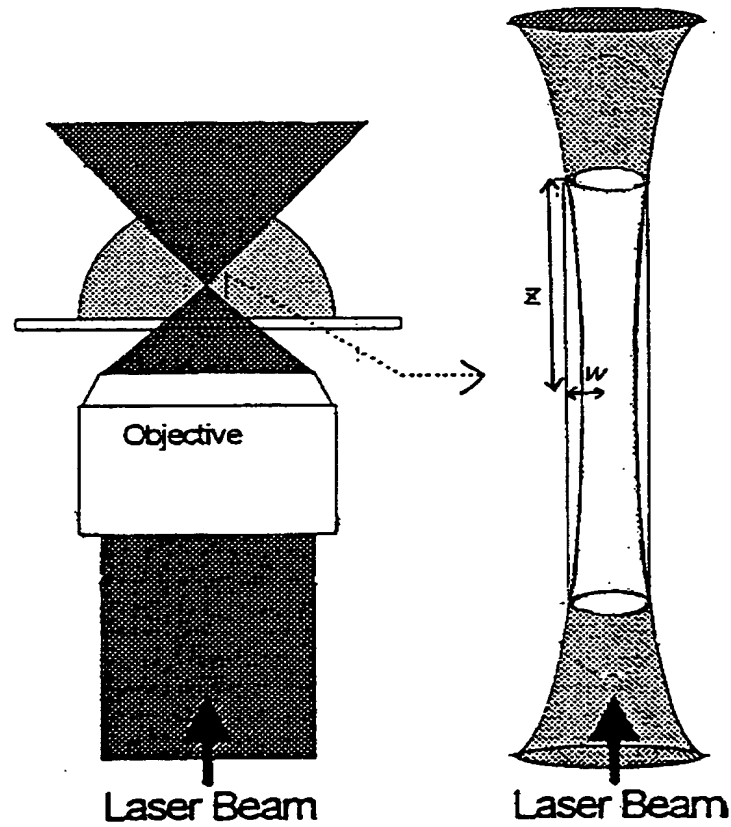
【図 1】



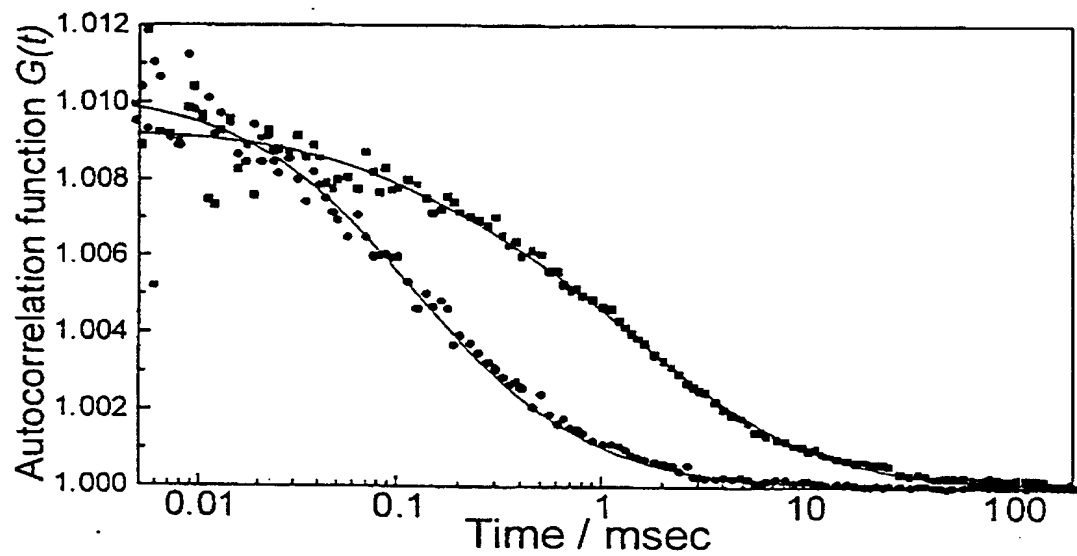
【図2】



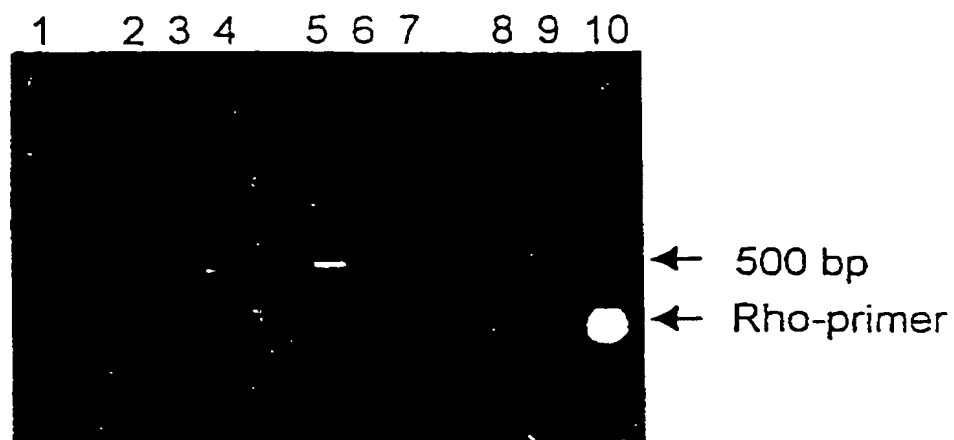
【图 3】



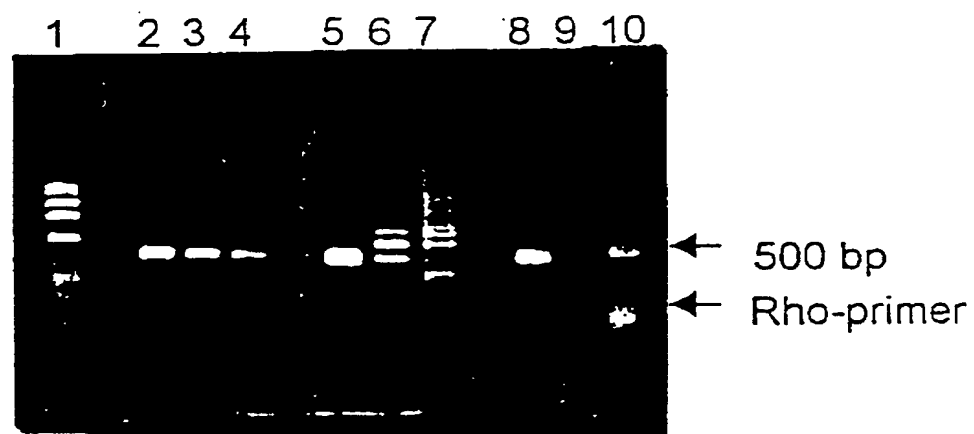
【图 4】



【図5】

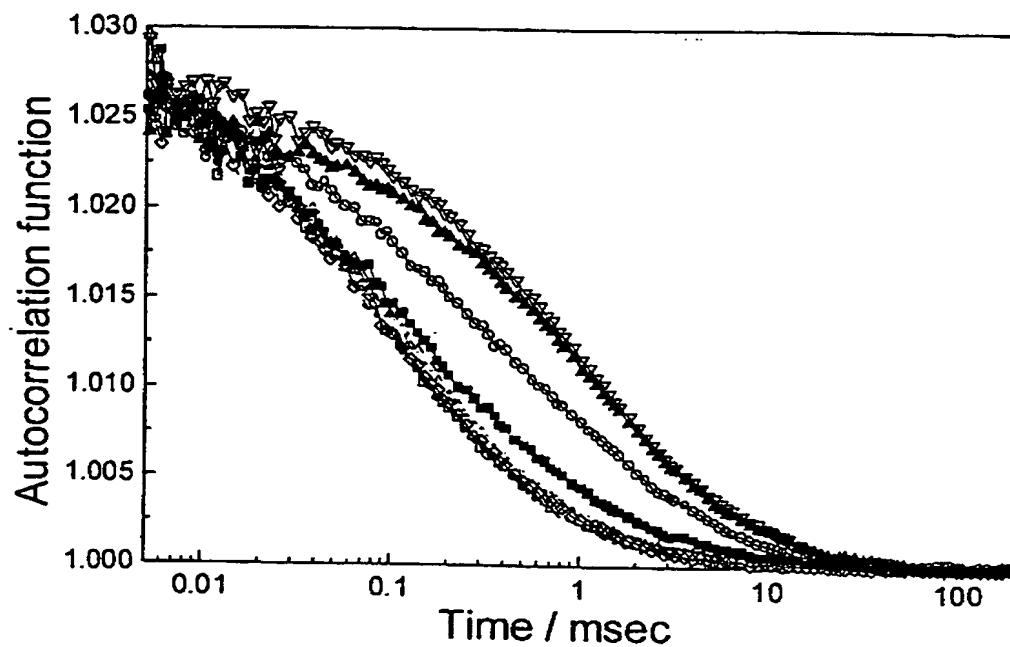


(A)

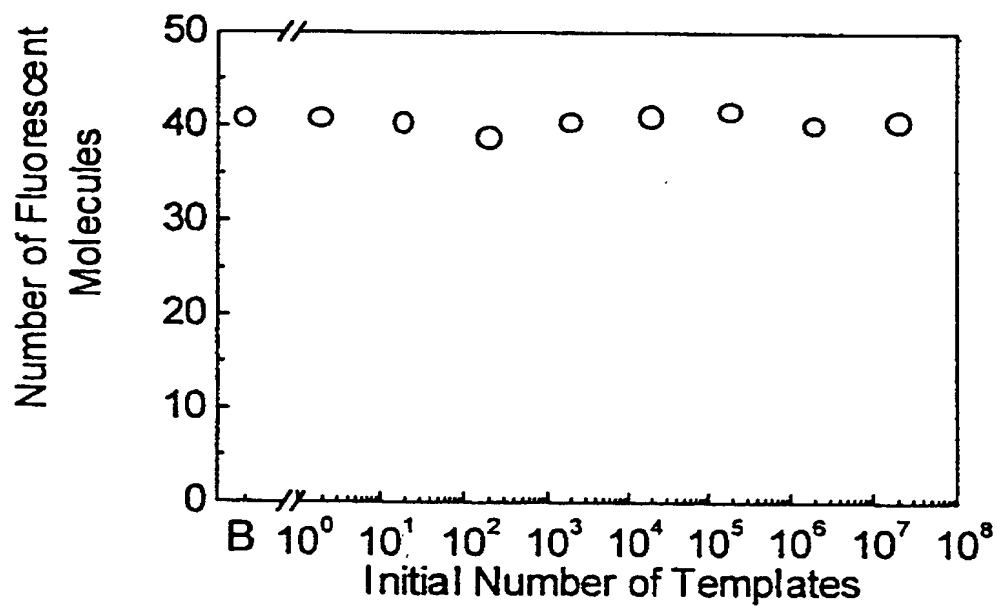


(B)

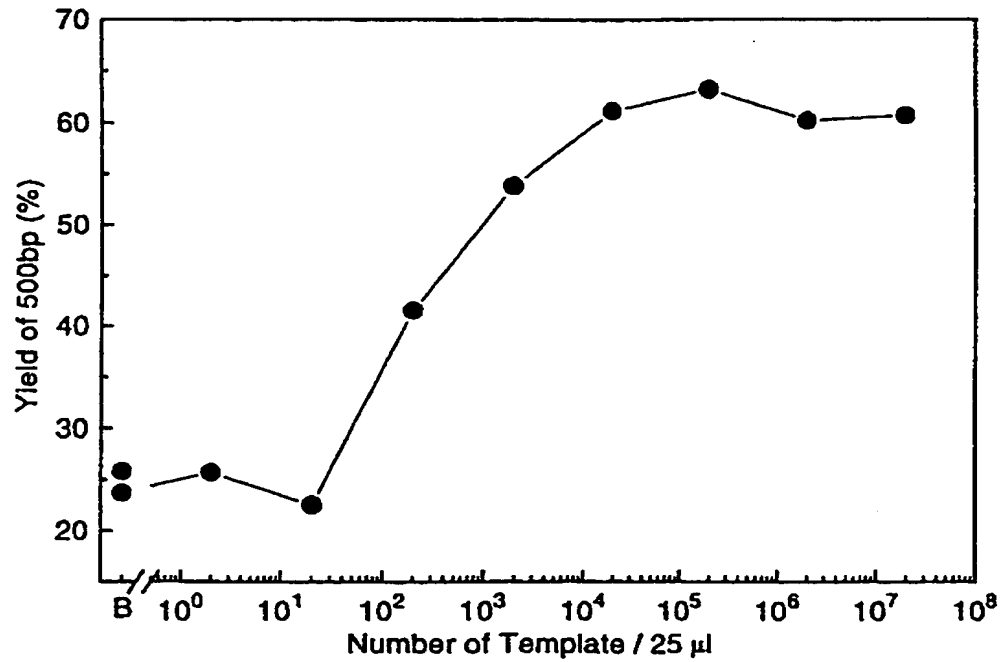
【図 6】



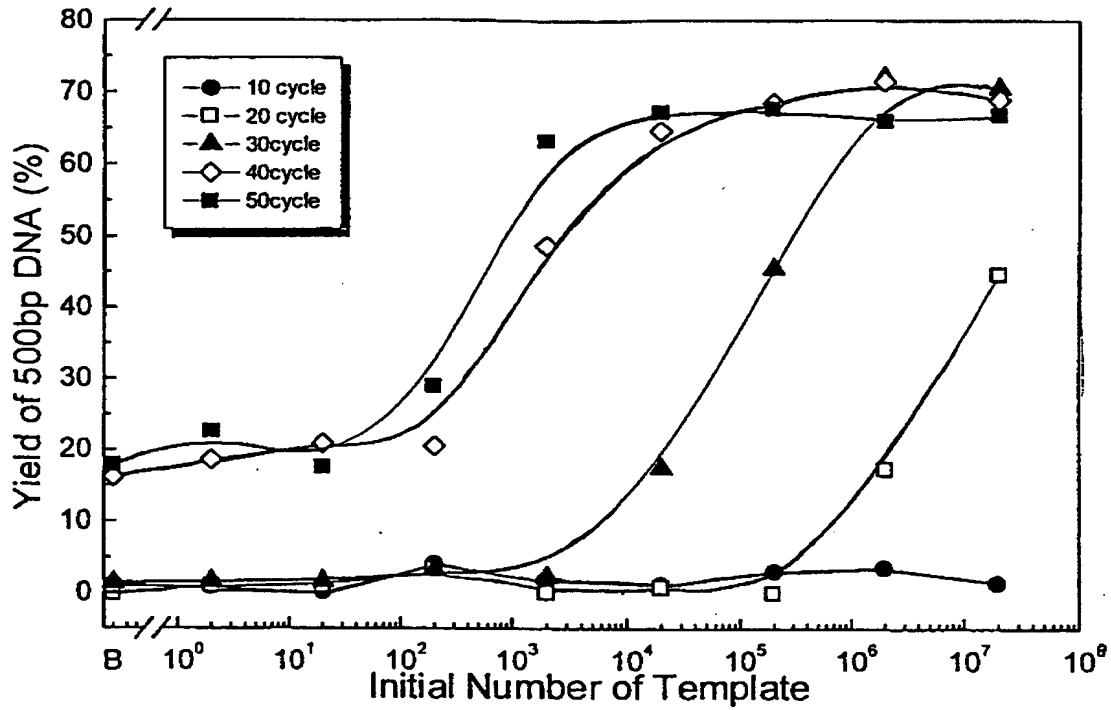
【図 7】



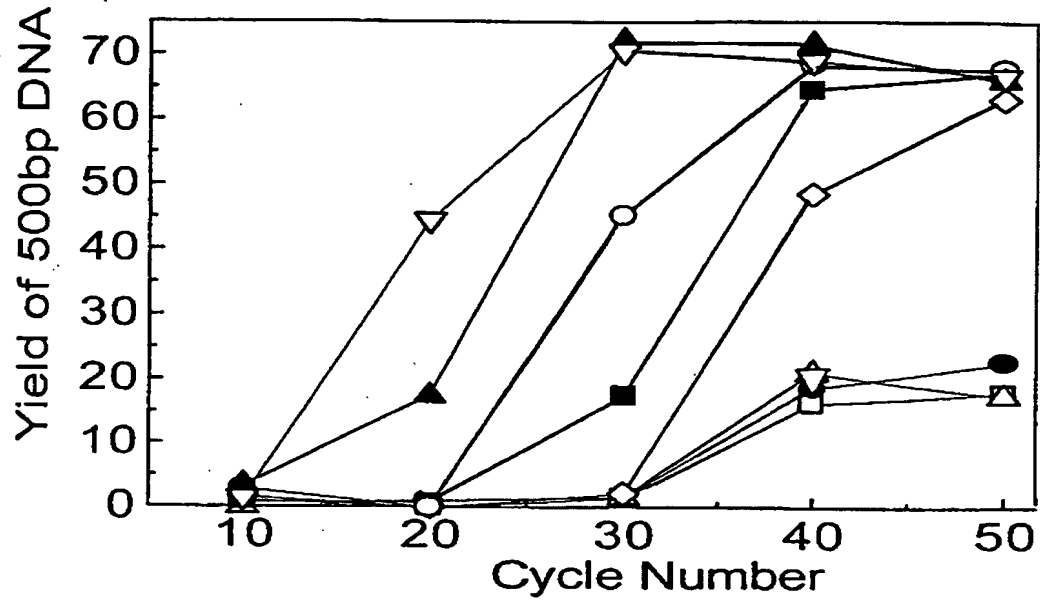
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 B o u n d / F r e e 分離が不要でありながら、定量性の高い核酸配列の増幅反応を用いた標的核酸分子の検出方法を提供する。

【解決手段】 非標識の第1プライマと蛍光標識された第2プライマとを、第1プライマよりも第2プライマが少ない混合数で試料含有液と混合して、適度な回数のPCRを行い、フォーカシングされたレーザー光線による3次元的な微小視野内にて個々の蛍光分子の挙動に依存した複数時点での測定データを得、これら測定データを位置的变化に応じた統計学的データに変換し、この統計学的データに基づいて試料中に含有する標的核酸分子の個数を決定する。

【選択図】 図6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598168151]

1. 変更年月日 1998年12月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市北区北23条西13丁目南新川宿舍10-404

氏 名 金城 政孝